

Gödöllői Agrártudományi Egyetem
Genetika és Növénytermesztés Tanszék

KANDIDÁTUSI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**In vitro morfogenezis
egy- és kétszikű növényekben**

Írta:

Dr. Gyulai Gábor
tudományos munkatárs

Gödöllő

1992

BEVEZETÉS ÉS CÉLKITÜZÉS

A növényi életciklus két szakaszának (sporogenezis, gametogenezis), három fázisában (vegetatív, generatív, reprodukív) kifejlődő négy merisztéma (gyökércsúcs-, hajtáscsúcs-, levél-, és virág merisztéma) differenciálódásával kialakuló öt specializálódott szervben (tápanyagfelvételi gyökér, tápanyagszállító szár, fotoszintetizáló levél, generatív virág, és reprodukációs termés, mag) található, 25 citológiaiag elkülöníthető típusú sejtben, több mint 50.000 struktúrgén működik *in vivo*.

Növényi hormonkezelésekkel az *in vitro* kultúrákban az életciklus egyes szakaszai egymástól elválaszthatók, illetve alternatív morfogenetikai utakra terelhetők (pl. gyökérfejlődés - gyökér kultúra, hajtásfejlődés- hajtástenyészet, virágzás - *de novo* virágindukció, megtermékenyítés és magfejlődés - szomatikus embriogenezis). Ez a lehetőség inspirálja a kutatásokat újabb morfogenetikailag aktív anyagok (hormonok) kifejlesztésére és *in vitro* alkalmazására (pl. dicamba, pikloram stb), illetve élettani-genetikai hatásmechanizmusaik biotesztkben történő vizsgálatára.

Az alternatív morfogenetikai utak közül az egyik legjelentősebb a haploid, ivarsejt eredetű embriogenezisnek (androgenesis, gynogenesis) az *in vitro* útja: a diploid, testi sejt eredetű, szomatikus embriogenezis.

Bebizonyosodott, hogy a szomatikus embriogenezis során az embrió fejlődése a zigótikus embriogenezis szakaszait követi az identikus növényregenerációig. E folyamat fontosabb stádiumai az egy- és kétszikű virágos növényekben a következők: (1) sűrű citoplazmájú, izodiametrikus, embriogén sejt, (2) embriogén

KISÉRLETI ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Sejt és szövettenyésztés

Dohány (*Nicotiana tabacum* L.)

Növényi tesztanyag, inokulum A vizsgálatokhoz a *Nicotiana tabacum* SR1 vonalának (Maliga & mtsi. 1975. *Nature*, 225:401-402) sterilen nevelt hajtástenyészetéből, a csúcstól számított első kifejtett levél alapi részéről vágott, adaxiális felszínével a táptalajra helyezett, 0.6 cm átmérőjű levélkorongokat alkalmaztam.

Kontroll hormonok: A következő auxinok: indolecetsav, indolvajsav, naftilecetsav, 2,4-diklorfenoxiecetsav, 2,4,5-triklorfenoxiecetsav, és citokininek: zeatin, benziladenin, kinetin szűrve sterilizett oldatait vizsgáltam a 10^{-9} - 10^{-4} mol koncentráció tartományban.

Táptalajok: A hajtástenyészet táptalaja 2/3 mennyiségű MS sókat (Murashige & Skoog 1962. *Physiol. Plant.*, 15:473-495), 2 % szacharózt és 0.8 % agart, pH 5.8, tartalmazott. A bioteszt táptalaja 1/10-re csökkentett CaCl_2 tartalmú, 2/3 MS sókat, 2 x mennyiségű LS-vitaminokat (Lihsmaier & Skoog 1965. *Physiol. Plant.*, 18:100-127), 2 % szacharózt, 0.8 % agart, valamint a szűrve sterilizett hormonokat tartalmazta (pH 5.8).

Inkubáció: 21 napig 24°C-on, sötétben történt.

Kiértékelés: Egy-egy petri csészében (9 cm \varnothing), 30 ml táptalajon, 10-10 levélkorong inkubációját végeztem háromszoros ismétlésben. A kiértékelés alapja a kifejlődött járulékos gyökerek és hajtások friss súlya alapján számított átlag-, szórás- és szignifikancia értékek voltak.

Agromus nemzetséghibrid (*Agropyron repens* L., Beauv. x *Bromus inermis* Leyss. cv. *nanus*)

Explantum: Az *AGROMUS* nemzetséghibrid kétéves, virágzás előtt álló egyedeinek, a kalászkezdeményt (2 cm) magába záró utolsó nodusz tagjait gyűjtöttem be. A zászlós levél visszavágását követően, a mintákat 4°C-on, sötétben, 5 napig, 2 mg/l GA₃ tartalmú MS tápoldatban kezeltem, zárt térben. Az ezt követő 0.2 % HgCl₂ sterilizés, 3 x steril vizes mosás után, a felnyitott levélhüvelyből a kalászkezdemény feldarabolt (0.5 cm-es) szegmentjeit, kallusz indukciós táptalajon inkubáltam.

Kallusz indukciós táptalaj: Két kontroll (MS, $\frac{1}{2}$ MS), valamint kilenc MS-alapú, makroelem kombinációjában változtatott táptalajt alkalmaztam, amelyekben a mezo- és mikroelem, valamint a vitamin kiegészítések azonos koncentrációjuak voltak. Tíz-tíz explantumot (9 cm \varnothing , 30 ml autóklávozott, 0.8 % agarral szilárdított táptalajon), háromszoros ismétlésben alkalmaztam.

Kallusz indukció és növényregeneráció: sötétben (21 nap), majd 1000 lux fényerőn (14 nap) történt. A regeneránsokat hormonmentes F-táptalajon (Gyulai & mtsi.1992a., *Plant Cell Rep.*, 11:266-269), (5.000 lux, 4 hét) hajtássokszorozó tenyészetben neveltem. A nyert klónok egyik részét citológiai vizsgálatokra, másik részét üvegházi kiültetésben, morfológiai vizsgálatokra alkalmaztam.

Statisztikai vizsgálatok: Az indukálódott kallusz tenyészetek friss súlya (az indukció 28. napján), valamint a regenerálódott hajtások (az indukció 42. napján) átlagértékeiből (háromszoros ismétlés, 10-10 belső ismétlés) számított átlag, szórás és szignifikancia ($P = 0.1$ %) értékek kerültek analízisre, az F-táptalajon kapott eredmények százalékában.

Sziki mézpázsit (*Puccinellia limosa* Schur., Holmbg.)

A sterilizált (detergens mosás, 0,2 % HgCl_2 , 5 perc), magokból (Agrobotanikai Központ, Tápiószéle), a kalluszindukciót az MS elemeket és 1 mg/l tiamint, 2 mg/l 2,4-D-t tartalmazó táptalajon, 28 napig, sötét inkubációval végeztük. A növényregenerációs táptalajban csökkentett mennyiségű 2,4-D-t (0,2 mg/l) és 0,5 mg/l kinetint alkalmaztunk.

Rizs (*Oryza sativa* L.)

A rizs (*Oryza sativa* L.) cv. *Orizella* magkallusz indukcióját a sterilizálást követően 2 mg/l 2,4-D, és 0,5 mg/l kinetin tartalmú, MS elemeket és 1 mg/l tiamint tartalmazó szilárd (0,8 % agar) táptalajon végeztük. A sötét inkubációt (28 nap, 24 °C) követően a képződött kallusz kolóniák embriogén részeiből (globuláris struktúrájú, kompakt szerkezetű és sárgás-fehér színű) indítottuk és tartottuk fenn a szuszpenziós kultúrát; AA táptalajon (Toriyama & Hinata 1985. *Plant Sci.*, 41:179-183, Müller & Grafe 1978. *Mol. Gen. Genet.*, 16:67-76). A növényregenerációt N6 táptalajon (Chu & mtsi 1975. *Sci. Sin.*, 18:659-668) végeztük, a táptalaj N6 elemeket, 2 mg/l benziladenint, 0,5 mg/l naftilecetsavat tartalmazott. A regenerációt megelőzően az 1,5 %-os NaCl kezelést, 3 hónapig, heti passzálassal, AA táptalajban alkalmaztuk.

Szója (*Glycine max* L., Merr.)

Kalluszindukció A szója növények (*Glycine max* L., Merr. cv. ISZ-15) 4 mm nagyságú embrióinak excizálását a felületileg sterilizált hüvelyekből végeztük. A csíratengely eltávolítása után, mindkét sziklevélfelület adaxiális felülettel, MS

kalluszindukciós táptalajon, sötétben, 24 °C-on inkubáltuk. A táptalaj különböző koncentrációjú (10, 20, 40 µM) 2,4-D hormont tartalmazott.

Növényregeneráció A 28 napos kalluszindukciót követően a szikleveleket, a felületükön megjelenő gömb-, és korai torpedó stádiumú szomatikus embriókkal együtt, $\frac{1}{2}$ MS elemeket, 1.7 µM benziladenint és 0.2 µM indolvajsavat tartalmazó növényregenerációs táptalajon, 1000 lux fényerőn, 24°C-on inkubáltuk. A 21 napos inkubáció során a teljes embriógenesis végbement, ezt követően a regenerálódott növényeket az $\frac{1}{2}$ MS elemeket és 0.1 % polivinil-pirrolidon, (Policlar AT, Serva) tartalmú gyökeresítő táptalajon neveltük fel.

Vadgesztenye (*Aesculus hippocastanum* L.)

A járulékos embriógenesis indukálását a sterilen izolált, 10 ± 0.3 mm nagyságú zigótikus embriókból végeztük, módosított MS táptalajon. A táptalajban MS elemeket, naftilecetsavat (1 mg/l, 5.4 µM), benziladenint (10 mg/l, 44 µM), 2 % szacharózt és 0.8 % agart alkalmaztunk. A differenciálódott adventív embriók (késői szikleveles stádiumtól) regenerációját, az $\frac{1}{2}$ makroelemeket tartalmazó, hormonmentes WPM táptalajon (Llyod & McCown 1980, *Proc. Intern. Plant Prop. Soc.*, 3:367-394) végeztük. A regeneráns növények üvegházi kiültetéséhez sterilizált perlitet alkalmaztunk.

Fény- és elektronmikroszkópos vizsgálatok

A fénymikroszkópos vizsgálatokban 4 x objektív és 2.5 x projektív lencsét alkalmaztam.

A pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a minták előkészítését a következő lépéseken keresztül végeztem: (1) fixálást (5 % glutáraldehid, foszfát pufferben 0.07 M, pH 7.2, 3-6 óra), (2) a fixáló oldat kimosását foszfát pufferrel (0.07 M, pH 7.2, 3 x 10 perc), (3) a víztelenítést aceton sorozatban (30-50-70-90-100 %), (4) a szárítást CO₂ kritikus pont szárítóban (Balzer CPD 020), (5) valamint az aranyozást (30 µm) gőzöltetett arannyal. A minták elemzését Tesla BS 300 Scanning Electron Mikroszkóppal végeztük.

Citológiai vizsgálatok

A citológiai vizsgálatokhoz alkalmazott mintákat a különböző citokinin (2 mg/l benziladenin, kinetin vagy zeatin) tartalmú F-táptalajokra oltott másodlagos kallusz kolóniákból vettük. A mintákat 24 óráig, 2 C°-on, 2 %-os szacharóz oldatban előkezeltük, 3 napig fixáltuk 95 % etanol:jégecet = 3:1 arányú keverékében, ezt követően festettük további 3 napig, 4 %-os kármínecetsav oldatban, majd hidrolizáltuk forró, 45 %-os ecetsavban. A mikroszkópos vizsgálatokhoz dörzspreparátumot alkalmaztunk 45 %-os ecetsavban (Dudits & mtsi. 1975, Can.J.Genet.Cytol., 18:263-269).

Molekuláris biológiai vizsgálatok

Totál RNS izolálás. A vadgesztenye (*Aesculus hippocastanum* L.) 3 különböző stádiumú (gömb, szív, és szikleveles embrió állapotú) adventív embrióiból, forró fenolos módszerrel végeztem a totál RNS izolálását. Az RNS koncentráció megállapításához az O.D. 260 nm értéket alkalmaztam.

RNS glioxiláció és gélelektroforézis. Az RNS minták denaturálását a glioxál-DMSO együttes alkalmazásával végeztem (Sambrook, Fritsch, Maniatis 1989. *Molecular*

cloning. A laboratory manual. vol.1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press). A gélelektroforézishez 1 %-os agarózt, 10 mM foszfátpuffert (pH 7.0) alkalmaztam, állandó kevertetés mellett.

Northern blott: A glioxilált RNS mintáknak és a próbának (EP-2) a Genescreen membránra történő átviteléhez 25 mM foszfát puffert alkalmaztam, 16 órán keresztül.

Prehibridizáció: A denaturált és blottolt mintákat hordozó Genescreen membrán prehibridizálásához formamidot (50 %), Denhardt reagenst (5x), és alacsony ionkoncentrációjú puffert (5x NaCl - Na-citrát, SSC puffer + 1 % SDS) alkalmaztam.

A próba (EP-2) rádióaktív jelzése. A próba random primer jelzését (α - 32 P) izotóppal jelzett [α - 32 P]dATP és oligonukleotidok (dGTP, dCTP, dTTP) jelenlétében végeztem.

Centrifugál-oszlop kromatográfia. A rádióaktív jelzést követően a nem inkorporálódott (α - 32 P) izotóp eltávolításához TE pufferrel (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH8.0) ekvilibrált Sephadex G-50 mikro oszlopot (1 ml), 1000 rpm-el centrifugáltam.

A jelzett DNS próba denaturálása. A jelzett próba (EP-2) Sephadex G-50 tisztítását követően a denaturálást 5' (100 °C), és 5' (jég) kezeléssel végeztem.

Hibridizáció. A glioxilált és Northern blottolt RNS mintákat, valamint a keresett gént (EP-2) hordozó Genescreen membránnak az [α - 32 P]dATP-vel random primer jelzett és denaturált génnel (EP-2) történő hibridizálását a prehibridizációt követően, 16 órán keresztül, 42 °C-on végeztem. A reakciót követő mosás (a, 2xSSC + 1 % SDS, 42°C; b, 2 x SSC + 1 % SDS, 65 °C) után az autoradiogrammok exponálásához (-70°C, 24 óra) Kodak x Omat AR filmet alkalmaztam.

ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÉS GYAKORLATI ALKALMAZÁSUK

1. Szelektív morfogenezis indukción alapuló bioteszt auxinok és citokininnek specifikus kimutatására

A növényi bioaktív anyagok: hormonok, hormonanalógok, hormongátlók, regulátorok, antidótumok, és hormonhatású gyomirtószerek hatásmechanizmusának felderítésére és igazolására bioteszt vizsgálatok szükségesek. Az eddig kifejlesztett biotesztek hormonszelektivitása, különösen az egyes hormonok kereszthatása következtében nem kielégítő.

Az általunk szabadalmaztatott eljárással; (1) megfelelő *in vitro* táptalaj kidolgozásával kifejlesztettem az első szorosabb értelemben vett auxin-specifikus biotesztet, amely egy auxin-függő, *de novo*, járulékos gyökérindukción alapul, (2) a citokininnek *in vitro* táptalajban történő egyedüli alkalmazásával kifejlesztettem az első virágos növényre kidolgozott citokinin-specifikus biotesztet, amely egy *de novo* járulékos hajtásindukción alapul, valamint (3) a két, az auxin és a citokinin-függő morfogenezis indukció egy rendszerben történő alkalmazásával először oldottam meg az auxin és citokinin hormonhatás szelektív különválasztását, a két hormon szinerg hatásának eliminálásával (Gyulai & mtsi. 1988-1992, Magyar Szabadalom, Lajstromszám: 204360). A biotesztben a gibberellinek és az abszcizinsav kereszthatását sikerült kizárni. A módszer így alkalmas egy ismeretlen hatású, bioaktív anyag hormoncsoportba sorolására, auxin illetve citokinin (induktív) aktivitásának meghatározására.

**2. Az *Agromus* (*Agropyron repens* L., Beauv x *Bromus inermis* Leyss. cv. *nanus*)
nemzetséghibrid szomatikus embriógenezise kallusz kultúrában**

A legtöbb termesztett növényfajt magába foglaló pázsitfűfélék (*Gramineae*) családjába számos gazdaságilag fontos fűfaj is tartozik. Ezek közül kiemelkedő fontosságú a nagy szárazságtűrűsű tarackbúza (*Agropyron repens* L., Beauv.) és a magas beltartalmi értékű magyar rozsnok (*Bromus inermis* Leyss. cv. *nanus*). A két faj nemzetséghibrid keresztezéssel előállított hibridje (*AGROMUS*) egyesítette a tarackbúza és a magyar rozsnok előnyös tulajdonságait, azonban egy a nemzetség hibridekre jellemző nagyfokú magsterilitással. A klasszikus nemesítési eljárásokkal párhuzamosan meginduló biotechnológiai program célja egy javított fertilitású szomaklón előállítása volt. A sejtenyészetekben fellépő szomaklonális variabilitás indukciójával olyan hibrid kombinációk (hibrid szomaklónok) előállítása lehetséges, amelyekből javított fertilitású szubsztitúciós hibridek szelektálhatók.

A feladat első részét, az *in vitro* növényregenerációs kidolgozását (Gyulai & mtsi. 1992a, *Plant Cell Rep.*, 11:266-269), a disszertációban közölt eljárásokkal; a kallusz indukcióhoz szükséges explantum megválasztásával (2 cm nagyságú kalászkedemény), megfelelő, az MS-táptalajhoz viszonyítva 4-szeres KH_2PO_4 (1160 mg/l, 8.4 μM) és $\frac{1}{2}$ -szeres NH_4NO_3 -t (956 mg/l, 12 μM) tartalmú, valamint felére csökkentett össz tápelem koncentrációjú (2.6 g/l, 22.5 μM) táptalaj kifejlesztésével, továbbá sikeres szomatikus embriógenezis indukcióval oldottam meg.

3. A sziki mézpázsit (*Puccinellia limosa* Schur., Holmbg.) szomatikus embriógenezise kalluszkultúrában

A sötítésre történő szelekcióban, valamint a sötítés genetikai és élettani kutatásában az extrém környezeti körülmények között élő növényfajok szolgáltatják a természetes vizsgálati anyagot (*Puccinellia*, *Suaeda*, *Camphorosma* fajok). Ezeknek a vizsgálatoknak az előfeltétele hatékony *in vitro* növényregenerációs rendszer alkalmazása. Munkánk során ezért dolgoztuk ki a sziki mézpázsit növény - sejt - növény rendszerét (Heszky & mtsi. 1989, *Plant Cell Rep.*, 8:174-177).

Ebben a rendszerben pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálattal igazoltam a szomatikus embriógenezisen keresztüli növényregenerációt. Meghatároztam az egyszikű fajok embriógenezisére jellemző embrió stádiumokat, a korai és kései szkutelláris, valamint a koleoptiláris embrió állapotokat.

4. A rizs (*Oryza sativa* L.) szomatikus embriógenezise sejtszuspenzióban, magas NaCl sóstressz előkezelést követően

A növényi sejt- és szövettenyészetek a hosszú *in vitro* inkubáció során elvesztik regenerációs képességüket. Az általunk vizsgált kísérleti rendszerben az embriogén-képességüket veszített rizs szuspenziós tenyészetekben 3 hónapos NaCl (1.5 %) kezeléssel, a növényregenerációs potenciál visszaállítható volt. A disszertációban közölt pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokkal igazoltam, hogy ebben a rendszerben a rizs növényregenerációja szomatikus

embriógenézisen keresztül megy végbe (Binh & mtsi. 1992, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 29:75-82). Meghatároztam az embriogén kalluszkra jellemző izodiametrikus sejteket, valamint jellemeztem a rizs szkutelláris és koleoptiláris stádiumú szomatikus embrióit.

5. Elsődleges és másodlagos szomatikus embriógenézis szója (*Glycine max* L., Merr.) szövettényészetben

A disszertációban a szója sziklevél eredetű növényregenerációjának fejlődésbiológiai elemzését végeztem el (Gyulai & mtsi. 1992c, *Acta Biol. Hung.*, közlésre elfogadva). Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokkal igazoltam a növényregeneráció embriogén útját, és a neomorf eredetű másodlagos embriógenézis fejlődési stádiumait. Meghatároztam az embriogén kallusztényészetben végbemenő, a szomatikus embriógenézisre jellemző embriófejlődési stádiumokat: az első inekvális, embriogén sejtosztódást, a 2-, 3-, és 4-sejtes proembrió, valamint a globuláris és szívstádiumú embrióállapotokat. A szomatikus embriók felszínén végbemenő másodlagos embriógenézisben jellemeztem a korai merisztéma centrum kifejlődését, valamint a globuláris és szívstádiumú másodlagos embriókat.

6. Adventív embriógenézis a vadgesztenye (*Aesculus hippocastanum* L.) zigótikus embriókultúrájában

A kalluszfázis nélküli embriógenézis során indukálódó embriók nagyfokú genetikai stabilitása lehetővé teszi a szintetikus mag kultúra kialakítását. Egy ilyen zigótikus-embrió eredetű kultúrában (Kiss & mtsi. 1992, *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 30:59-64) pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokkal igazoltam,

hogy a vadgesztenye növényregenerációja, kallusz fázis nélküli, közvetlen járulékos embriogenezisen keresztül történik. Meghatároztam a kétszikű növényekre jellemző gömb-, szív-, torpedó- és szikleveles embrióstádiumokat, valamint jellemeztem a 3- és 5 szikleveles embrió aberránsokat.

7. A sárgarépa (*Daucus carota* L.) embriogenezis marker génjének (EP-2)

expressziós vizsgálata a vadgesztenye (*Aesculus hippocastanum* L.) járulékos embrióiban

A növényi morfogenezis génregulációjának kutatásában az elsődleges cél olyan jelző gének kimutatása, amelyek speciális markerei az egyes morfogenetikai folyamatoknak. A szomatikus embriogenezis, mint a zigótikus embriogenezis *in vitro* alternatív útja lehetőséget ad az embrióspecifikus gének izolálására és expressziójuk vizsgálatára.

A disszertációban a sárgarépa eredetű, 737 bp hosszúságú, 10 kD molekulásúlyú, extracelluláris lipid transzfer proteint kódoló EP-2 génnek a vadgesztenye szomatikus embrióiban történő expresszióját vizsgáltam. Kísérleteimben a pozitív kontroll kísérletek ellenére, nem sikerült kereszthibridizációt kimutatni, amely eredmény feltételezi, hogy a keresett EP-2 gén a vadgesztenye embriogenezisének vizsgált stádiumaiban nem expresszálódik.

AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN MEGJELENT PUBLIKÁCIÓK

KÖNYVFEJEZETEK

Gyulai, G., E.Kiss, L.E.Heszky (1992): A repce (*Brassica napus* L.) biotechnológiája. in: *Magyarország Kultúrflórája*. 65. kötet, Az olajrepce - *Brassica napus*. szerk. Sz.Priszter, Akadémiai Kiadó Budapest.

Gyulai, G. (1992): Plant hormone Bioassays. in: *Growth Regulators and their application in Agriculture, Horticulture and Forestry*. Chapter: Application of growth regulators in tissue culture. (eds.: L.S. Jankiewicz, T.Orlikowska), Polish Scientific Publishers, Varsó.

TUDOMÁNYOS CIKKEK

Gyulai, G., J.Janovszky, E.Kiss, L.Lelik, A.Csillag, L.E.Heszky (1992a): Callus initiation and plant regeneration from inflorescence primordia of the intergeneric hybrid *Agropyron repens* (L.) Beauv. x *Bromus inermis* Leyss. cv. *nanus* on a modified nutritive medium. *Plant Cell Rep.*, 11:266-269.

Gyulai, G., Kiss E., Heszky L.E. (1992b): Biotechnology of rapeseed (*Brassica napus* L.). *Acta Agron. Hung.*, 41:277-287.

Gyulai, G., E.Kiss, A.Csillag, L.E.Heszky (1992c): Developmental analysis of primary and secondary somatic embryogenesis in soybean tissue culture. *Acta Biol. Hung.*, (közlésre elfogadva).

Binh, D.Q., L.E.Heszky, G.Gyulai, A.Csillag (1992): Plant regeneration of NaCl-selected embryogenic cells from long-term suspension culture of rice (*Oryza sativa* L.) in saline conditions. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 29:75-82.

Binh, D.Q., L.E.Heszky, G.Gyulai, E.Kiss, A.Csillag (1989): Plant regeneration from callus of *Puccinellia distans* (L.) Parl. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 18:195-200.

Kiss, J., L.E.Heszky, E.Kiss, G.Gyulai (1992): High efficiency adventive embryogenesis on somatic embryos of anther, filament and immature proembryo origin in horse-chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) tissue culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 30:59-64.

Kiss, E., L.E.Heszky, G.Gyulai (1991): Progress and problems of biotechnology in the soybean (*Glycine max* L., Merr.). *Acta Agron.Hung.*, 40: 217-236.

Kiss, E., L.E.Heszky, G.Gyulai, Zs. Horváth, A.Csillag (1991): Neomorph and leaf differentiation as alternative morphogenetic pathways in soybean tissue culture. *Acta Biol. Hung.*, 42:313-321.

Heszky, L.E., Li S.N., I.Simon-Kiss, K.Lőkös, G.Gyulai, E.Kiss (1989): Organ-specific and ploidy-dependent somaclonal variation; a new tool in breeding. *Acta Biol. Hung.*, 40:383-394.

Heszky, L.E., D.Q.Binh, E.Kiss, G.Gyulai (1989): Increase of green plant regeneration efficiency by callus selection in *Puccinellia limosa* Schur., Holmbg. *Plant Cell Rep.*, 8:174-177.

SZABADALOM

Gyulai, G., L.E.Heszky, E.Kiss, Zs.Jekkel, K.T.Lőkös (1988-1992): Eljárás biológiailag aktív anyagok auxin, illetve citokinin aktivitásának szelektív meghatározására. *Magyar Szabadalom, Lajstromszám:* 204360.